

Takeshi et al.

JP-08-133990

English Translation

pub. date 28.05.1996

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the reactant microsphere which uses an oxyalkylene (Pori) derivative as a macro monomer component, and the functional matter fixed microsphere with which the functional matter was fixed by this microsphere. It is related with the reactant microsphere and functional matter fixed microsphere which can be used as a diagnostic drug, a drug carrier, a functional coating, a functional color, functional ink, etc. in more detail.

[0002]

[Description of the Prior Art] In the field of a coating or a diagnostic drug, the latex or microsphere which consists of polystyrene is used widely. However, it is difficult to use these for the latex or microsphere which consists only of polystyrene independently in a drainage system medium, since underwater distributed stability is bad and tends [ especially ] to sediment among a solvent, and concomitant use with a surfactant etc. is required for it. Moreover, since protein and the functional group which reacts do not exist in polystyrene latex when using polystyrene latex as support for diagnostic drugs especially, the support approach of an antibody becomes what is depended on an adsorption equilibrium, and has the trouble that the amount of antibodies by which adsorption support is carried out for this reason is restricted, or the antibody which carried out adsorption support tends to \*\*\*\*. Furthermore, other protein which lives together in a specimen adsorbs nonspecific, and there is also a trouble of reducing detection sensitivity and dependability.

[0003] For this reason, although the monomer which has the functional group which carries out covalent bond to functional matter, such as protein, easily by using it as the monomer which can give moisture powder stability to the polystyrene latex or the microsphere obtained by carrying out copolymerization to styrene etc., or a monomer of the macromolecule for diagnostic drugs is demanded, the compound to which such a request is fully satisfied is not known. Therefore, the microsphere excellent in underwater distributed stability to which the request in the field of a coating or a diagnostic drug is fully satisfied is not obtained. Moreover, the microsphere which can fix functional matter, such as protein, easily by the chemical bond on a microsphere front face is not obtained, either.

[0004] By the way, the polyoxyalkylene derivative which has a functional group at the piece end

at a polymerization nature double bond and the piece end of another side is indicated by JP,57-92332,A, and it is used for it as a monomer component of a photopolymer constituent. However, using this compound as a macro monomer for manufacturing the macromolecule for proteinic functional matter immobilization is not suggested.

[0005]

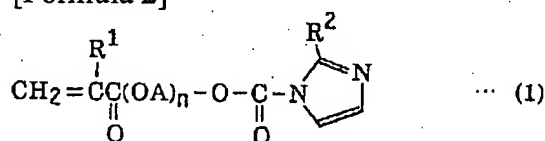
[Problem(s) to be Solved by the Invention] It excels in the distributed stability in the inside of water or an organic medium, and, moreover, the purpose of this invention can fix functional matter, such as protein, in stability by the chemical bond easily, and is offering the reactant microsphere with which nonspecific adsorption's, such as protein's, cannot happen easily. Other purposes of this invention are the microspheres with which functional matter, such as protein, was fixed to the above-mentioned reactant microsphere by the chemical bond, and are offering the functional matter fixed microsphere with which the activity of the matter which the desorption of the fixed matter did not happen but was moreover fixed is fully demonstrated.

[0006]

[Means for Solving the Problem] This inventions are the following reactant microsphere and the functional matter fixed microsphere with which the functional matter was fixed by this reactant microsphere.

[0007] (1) General formula (1)

[Formula 2]



Among [type, the oxyalkylene radical of carbon numbers 2-4 and n are the numbers of average addition mols of an oxyalkylene radical, and OA expresses the positive number of 1-1000. Even if one sort of things have added the oxyalkylene radical, two or more sorts of things may add it. Even if it has added in the shape of random in the case of two or more sorts, you may add in the shape of a block. R1 and R2 express a hydrogen atom or a methyl group independently, respectively. ] The reactant microsphere characterized by coming out and consisting of an oxyalkylene derivative expressed (Pori) and a copolymer with a hydrophobic radical polymerization nature monomer.

(2) The functional matter fixed microsphere characterized by fixing the functional matter to the reactant microsphere of the above-mentioned (1) publication.

[0008] In this invention, "oxyalkylene (Pori)" means oxyalkylene or polyoxyalkylene. The oxyalkylene radical expressed with OA of a general formula (1) is an oxyalkylene radical of carbon numbers 2-4, and is an oxyethylene radical, an oxypropylene radical, an oxy-trimethylene radical, oxy--1-ethyl ethylene, and oxy- - 1, 2-dimethyl ethylene, an oxy-tetramethylen radical, etc. are raised. These oxyalkylene radicals are radicals to which the addition polymerization of the alkylene oxide, such as ethylene oxide, propylene oxide, oxetane, 1-butene oxide, 2-butene oxide, and a tetrahydrofuran, was carried out.

[0009] n of a general formula (1) -- 1-1000 -- desirable -- 2-500 -- it is the positive number of 5-300 still more preferably. When n is two or more, what has the same class of oxyalkylene radical may differ. In the case of the latter, even if it has added at random, you may add in the shape of a

block. When giving a hydrophilic property, what ethylene oxide added independently as OA is desirable; and three or more things have desirable n in this case. moreover, the case where the oxyalkylene from which a class differs has added -- ethylene oxide -- 20-mol % -- desirable -- more than 50 mol % -- having added is desirable. (Pori) When giving oleophilic to an oxyalkylene chain, the numbers of addition mols other than ethylene oxide are made [ many ].

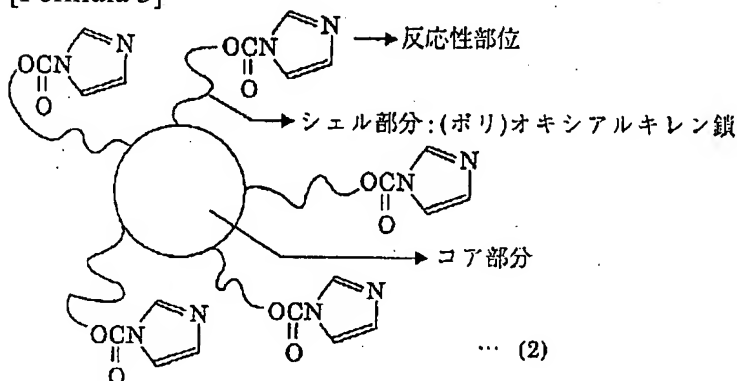
[0010] As that from which the class of oxyalkylene radical differs, what the oxyethylene radical and the oxypropylene radical added at random, the thing added in the shape of a block like a polyoxyethylene/polyoxypropylene, or the thing added in the shape of a block like a polyoxyethylene / polyoxypropylene / polyoxyethylene is raised, for example.

[0011] The oxyalkylene derivative expressed with a general formula (1) (Pori) On the mono-methacrylic ester of alkylene glycol or mono-acrylic ester, and a concrete target, for example, (Pori), alpha-methacryloyl-omega-hydroxy poly (oxyethylene) etc., N and N'-carbonyldiimidazole with a non-solvent or in organic solvents, such as benzene, toluene, chloroform, an acetonitrile, a tetrahydrofuran, and 1,4-dioxane - It is 0-100 degrees C preferably, and 100-+150 degrees C can be easily manufactured by making it react preferably for 1 to 4 hours for for 10 minutes to 100 hours. After reaction termination can be easily isolated and refined by approaches, such as an extract, distillation, recrystallization, reprecipitation, dialysis, an ultrafiltration, gel filtration, ion-exchange-resin processing, and adsorbent processing.

[0012] The reactant microsphere of this invention is what consists of a copolymer of the oxyalkylene derivative expressed with a general formula (1) (Pori), and a hydrophobic radical polymerization nature monomer. It is the particle which has the structure which the principal chain of a copolymer accumulated on the core and the oxyalkylene chain which is a side chain of a copolymer (Pori) accumulated on shell. (Pori) Functional groups, such as an amino group, a hydroxyl group, or a thiol group, the oxycarbonyl imidazole group which has high labile to the 1st class amino group especially, or its substituent exists at the tip of an oxyalkylene chain. Although especially the particle size of a reactant microsphere is not limited, a 100-500nm thing is preferably desirable the mean particle diameter of 1-1000nm.

[0013] If the reactant microsphere of this invention is shown typically, it can express like a degree type (2).

[Formula 3]



[0014] When giving a hydrophilic property to the reactant microsphere of this invention, it is desirable to use that whose OA is independent addition of ethylene oxide as an oxyalkylene

derivative expressed with a general formula (1) (Pori), and it is desirable that especially n uses three or more things. the case where the classes of oxyalkylene radical differ -- ethylene oxide -- more than 20 mol % -- desirable -- more than 50 mol % -- it is desirable to use the added polyoxyalkylene derivative. Since the polyoxyalkylene chain of a hydrophilic property is accumulated on the surface of a microsphere as by using such a polyoxyalkylene derivative showed to said formula (2), the microsphere excellent in moisture powder stability is obtained. Moreover, since a polyoxyethylene chain or polyoxyalkylene chain with many addition mols of an oxyethylene radical shows amphiphilic, such a reactant microsphere is excellent in distributed stability in organic solvents, such as ethyl acetate, ethanol, a methanol, propanol, and a butanol. When giving oleophilic to a reactant microsphere, an oxyalkylene derivative with many (Pori) addition mols of alkylene oxide other than ethylene oxide is used.

[0015] As said hydrophobic radical polymerization nature monomer The oxyalkylene derivative and the hydrophobic monomer in which a radical polymerization is possible which are expressed with a general formula (1) (Pori) can be used. For example, styrene, p-chloro styrene, m-chloro styrene, p-bromostyrene, m-bromostyrene, p-methyl styrene, m-methyl styrene, p-ethyl styrene, Styrene derivatives, such as m-ethyl styrene, p-divinylbenzene, and m-divinylbenzene; Benzyl (meta) acrylate, Acrylic derivatives, such as methyl (meta) acrylate, ethyl (meta) acrylate, and butyl (meta) acrylate; vinyl ester derivatives, such as vinyl acetate and benzoic-acid vinyl, etc. are raised. In these, since it says that it excels especially in the stability in the water dispersion condition of a styrene derivative, especially the reactant microsphere which specific gravity generates small, styrene is desirable.

[0016] The reactant microsphere of this invention can be manufactured by carrying out the radical polymerization of the oxyalkylene derivative expressed with a general formula (1) (Pori), and the hydrophobic radical polymerization nature monomer in the mixed solvent of water and water, and a mixable organic solvent. As the above-mentioned organic solvent, a methanol, ethanol, an acetonitrile, a tetrahydrofuran, 1,4-dioxane, dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, dimethyl acetamido, etc. can use it preferably. Especially in these, ethanol is desirable. As for the mixed rate of an organic solvent and water, it is desirable 5:95-99:1 (five to 99 volume %), and to be preferably referred to as 50:50-95:5 (50 to 95 volume %) by the volume ratio of organic solvent:water. A reactant microsphere is not formed even if it uses by the water independent or the organic solvent independent as a reaction solvent.

[0017] As for the blending ratio of coal of the oxyalkylene derivative and radical polymerization nature monomer which are expressed with a general formula (1) (Pori), it is desirable 0.01:99.9-50:50 and to be preferably referred to as 0.5:99.5-30:70 by the mole ratio of an oxyalkylene (Pori) derivative:monomer. If it comes outside the above-mentioned range, a reactant microsphere will become is hard to be formed. As for the total monomer concentration in a mixed solvent, considering as 0.1 - 10 mol/l is preferably desirable 0.001 to 100 mol/l. If it comes outside this range, a reactant microsphere will become is hard to be formed.

[0018] It is desirable to perform a reaction to the bottom of existence of a radical polymerization initiator. As a radical polymerization initiator, the peroxide or azo compound whose 10-hour half-life temperature is 10-150 degrees C is desirable. For example, inorganic peroxides, such as ammonium persulfate; A benzoyl peroxide, Tert butylhydroperoxide, diisopropyl peroxy dicarbonate; Organic peroxide, such as t-butylperoxy (2-ethylhexanoate); 2 and 2'-azobis [2-(5-

methyl-2-imidazoline-2-IRU) propane] dihydrochloride, 2 and 2'-azobis [2-(2-imidazoline-2-IRU) propane] dihydrochloride, 2 and 2'-azobis [2-(2-imidazoline-2-IRU) propane], Azo compounds, such as 2,2'-azobis isobutyronitrile, 2, and 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, 2, and 2'-azobis (2-methyl butyronitrile), 4, and 4'-azobis (4-cyano valeric acid), etc. are raised. As for the operating rate of a radical polymerization initiator, it is desirable to consider as 0.1-5-mol% preferably to the total number of monomer mols 0.001-10-mol%.

[0019] a polymerization reaction -- the inside of the degassing sealed tube, or the bottom of inert gas ambient atmospheres, such as nitrogen, an argon, and a carbon dioxide, -- the reaction temperature of 0-150 degrees C -- desirable -- 10-60 degrees C and reaction time -- it can carry out on the conditions of 1 - 24 hours preferably for 30 minutes to 100 hours.

[0020] Moreover, as an option, a reactant microsphere can be similarly obtained by approaches, such as light, a radiation polymerization method, etc. by the exposure of ultraviolet rays, an electron ray, a gamma ray, etc. Thus, the reactant microsphere excellent in the mono dispersion nature of the mean particle diameter of 1-1000nm and about 5 - 30% of CV values can be obtained by choosing terms and conditions, such as monomer concentration at the time of a polymerization, a solvent presentation, and a monomer presentation. The obtained reactant microsphere remains as it is, or after refining by approaches, such as centrifugal separation, sedimentation, dialysis, an ultrafiltration, gel filtration, ion-exchange-resin processing, and adsorbent processing, it can be used.

[0021] The reactant microsphere of this invention is the thing of the structure which the principal chain part accumulated on the core and the oxyalkylene (Pori) chain accumulated on shell, and is excellent in the distributed stability in the inside of water or an organic solvent as shown in said formula (2). Furthermore, since the oxycarbonyl imidazole group excellent in reactivity or its substituent exists at the tip of an oxyalkylene (Pori) chain and this radical serves as ligand for functional matter immobilization, it is possible to fix various functional matter by chemical association. For this reason, it can be suitably used as a base material (support) which fixes the functional matter. Moreover, in addition to this, a color and a pigment are infiltrated into the core section, and it can be used as a functional color, and also can also be used as functional ink, a functional coating, etc.

[0022] The functional matter fixed microsphere of this invention is a microsphere with which the functional matter was fixed to said reactant microsphere by the chemical bond (covalent bond). Although especially the functional matter to fix is not limited, physiological active substance; physic, such as external stimulus responsibility compound; enzymes, such as marker; light responsibility compounds, such as coloring matter, a color, a radiation label compound, a fluorescence compound, a chemiluminescence compound, and an electrode sensitivity compound, pH responsibility compound, and a heat responsibility compound, an antibody, an antigen, other protein, sugar, a lipid, a glycoprotein, a glycolipid, and hormone, etc. is raised, for example. In these, what has the amino group, a hydroxyl group, or a thiol group in a molecule is desirable, and what has especially an oxycarbonyl imidazole group or its substituent, and the 1st class amino group which reacts easily is desirable.

[0023] as the concrete thing of the above-mentioned antibody -- a polyclonal antibody, monoclonal antibodies, and these parts -- a unit etc. is raised. Homo sapiens, a goat, a sheep, a rabbit, a fowl, etc. may be the things of what kind of the animal species origin, or these

antibodies may originate in what kind of hybridoma. Moreover, as a concrete thing of the above-mentioned antigen, protein, an oligosaccharide, macromolecule sugar, low-molecular hapten, cholesterol, etc. are raised. However, in the case of hapten, it is required to have the functional group of either the amino group, a hydroxyl group or a thiol group in the intramolecular because of immobilization. The microsphere with which such an antibody or an antigen was fixed is suitably used as a diagnostic drug.

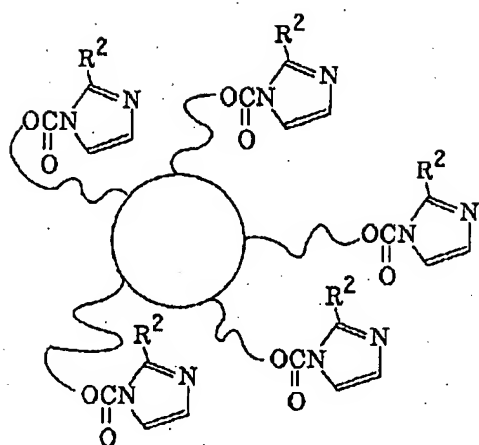
[0024] Immobilization of the functional matter is performed by forming covalent bond, such as amide association, an ester bond, or thiol ester association, between the oxycarbonyl imidazole group of a reactant microsphere or its substituent, and functional groups, such as an amino group of the functional matter, a hydroxyl group, or a thiol group. The functional matter fixed microsphere of this invention can be easily manufactured by contacting said reactant microsphere and functional matter. The approach of adding and stirring the functional matter to the suspension of a reactant microsphere as the contact approach etc. is employable.

[0025] Immobilization of the functional matter to the reactant microsphere of this invention can be performed by making a reactant microsphere and the functional matter react in a reaction solvent. as a reaction solvent -- water, physiological sodium chloride solution, or pH=5-12 -- desirable -- organic solvent [ , such as buffer-solution; ethanol, such as a phosphate buffer solution of 7-11, the carbonic acid buffer solution, citrate buffer solution, tris buffers, and the acetic-acid buffer solution, a methanol, an acetonitrile, a tetrahydrofuran, 1,4-dioxane, dimethylformamide, dimethyl acetamido, and dimethyl sulfoxide, ]; -- a mixed solvent with these organic solvents and water, physiological sodium chloride solution, or said buffer solution etc. can be used.

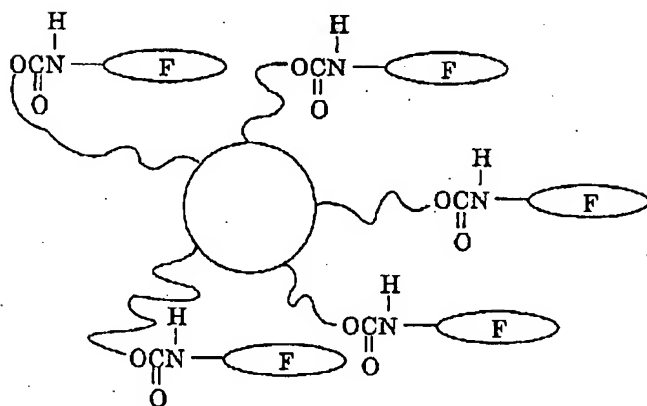
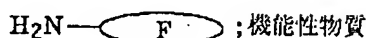
[0026] the concentration of the reactant microsphere in a reaction solution -- 0.001 - 50 % of the weight -- desirable -- the concentration of 0.01 - 30 % of the weight, and the functional matter -- 1nmol/l- it is desirable to make one mol /into 1micromol/l - 100 mmol/l preferably l. As for reaction temperature, it is preferably desirable in the case of a reaction with the amino group, to make it as 30-80 degrees C in the case of a reaction with 25-60 degrees C, a hydroxyl group, or a thiol group, and for reaction time to make it for [ 1 minute ] - 48 hours preferably for for 10 minutes to 200 hours 0-100 degrees C. When it becomes out of range [ such conditions ], it is in the inclination for the stability of a microsphere to worsen. When using the microsphere which fixed the functional matter as a diagnostic drug, it is desirable to use that whose mean particle diameter is 100-500nm as a reactant microsphere.

[0027] If the fixed reaction of a reactant microsphere and the functional matter which has an amino group is shown typically, it will become like a degree type (3).

[Formula 4]



反応性マイクロスフェア



機能性物質固定化マイクロスフェア

... (3)

[0028] The mixture after reaction termination can be refined by approaches, such as centrifugal separation, sedimentation, gel filtration, ultrafiltration, dialysis, ion-exchange-resin processing, and adsorbent processing. Thus, since, as for the obtained functional matter fixed microsphere, the functional matter was being fixed by covalent bond, the desorption of the functional matter did not happen but was fixed by stability. Moreover, since the oxyalkylene (Pori) chain is piling up the front face, even when nonspecific adsorption of protein etc. cannot take place easily, either and a functional matter fixed microsphere is used as a diagnostic drug for this reason, it becomes what has high detection sensitivity and dependability. The activity of the functional matter furthermore fixed is also fully demonstrated. The functional matter fixed microsphere of this invention can be used as immobilized enzyme, a drug carrier, etc. besides a diagnostic drug.

[0029]

[Effect of the Invention] It can fix the functional matter in stability by the chemical bond easily while it is excellent in the distributed stability in the inside of water or an organic solvent, since the reactant microsphere of this invention consists of copolymers of the oxyalkylene derivative expressed with a general formula (1) (Pori), and a hydrophobic radical polymerization nature monomer. Moreover, nonspecific adsorption, such as protein, cannot happen to a reactant microsphere easily.

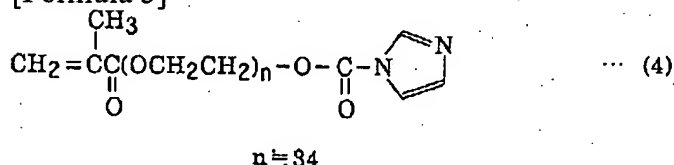
[0030] Since, as for the functional matter fixed microsphere of this invention, the functional matter is being fixed by the above-mentioned reactant microsphere by the chemical bond, the desorption of the functional matter does not happen but the activity of the functional matter moreover fixed is fully demonstrated.

[0031]

[Example] Hereafter, although still more detailed explanation is given according to an example, this invention is not limited to these.

alpha-methacryloyl-omega-hydroxy polyoxyethylene (n\*\*7.6) 10.00g (23.8mmol) and N, and N'-carbonyldiimidazole 3.86g (26.2mmol) was mixed among synthetic example 1 benzene, and it stirred at the room temperature for 24 hours. 20ml of distilled water washed this 3 times, after drying with anhydrous sodium sulfate, it freeze-dried, and the polyoxyalkylene derivative of the bottom type of the shape of white powder (4) was obtained.

[Formula 5]



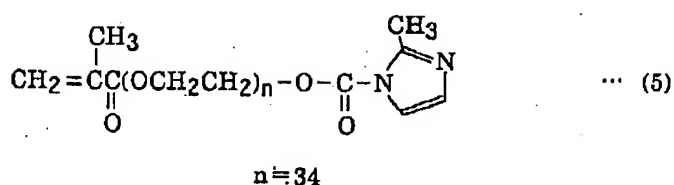
[0032] In 5ml (water: ethanol =2:8 (v/v)) of 80% ethanol water solutions used as one to example 1 solvent As a polymerization initiator, 2 2'-azobis [2-(2-imidazoline-2-IRU) propane] 2.5mg (it is 1.5-mol% to a 100micromol; all monomer), Polyoxyalkylene derivative 0.57mmol obtained in the synthetic example 1 and styrene 2.88mmol were taught, and the polymerization was performed among the degassing sealed tube, carrying out shaking gently at 60 degrees C for 48 hours. Then, it dialyzed in a lot of distilled water for 48 hours, and reactant microsphere dispersion liquid were obtained. It is COULTER about the particle size of the obtained reactant microsphere. It measured using N4 mold submicron particle analyzer. Mean particle diameter and a CV value are shown in Table 1.

[0033] Like example 1-2 - 1-5 example 1-1, various monomer combination was changed as Table 1, however the reactant microsphere was obtained. In addition, each example used the polymerization initiator in the amount which becomes 1.5-mol% to all monomers. The particle size and the CV value of a reactant microsphere which were acquired are shown in Table 1.

[0034] The reactant microsphere was obtained like one to example 6 example 1-1 using the bottom-type (5) polyoxyalkylene derivative. The particle size and the CV value of a reactant microsphere which were acquired are shown in Table 1.

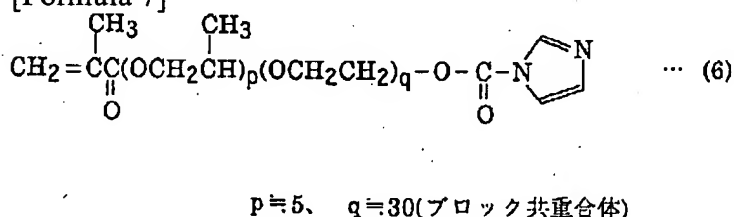
[Formula 6]





[0035] The reactant microsphere was obtained like one to example 7 example 1-1 using the bottom-type (6) polyoxyalkylene derivative. The particle size and the CV value of a reactant microsphere which were acquired are shown in Table 1.

[Formula 7]



[0036]

[Table 1]

表 1

|        | (ポリ)オキシアルキレン誘導体<br>(mmol) | ラジカル重合性<br>単量体<br>(mmol) | 平均粒径<br>(nm) | CV値<br>(%) |
|--------|---------------------------|--------------------------|--------------|------------|
| 実施例1-1 | 0.57                      | スチレン 2.88                | 106          | 15         |
| 実施例1-2 | 0.57                      | スチレン 5.76                | 114          | 17         |
| 実施例1-3 | 0.57                      | スチレン 8.64                | 122          | 23         |
| 実施例1-4 | 0.57                      | p-クロロスチレン 2.88           | 178          | 28         |
| 実施例1-5 | 0.57                      | p-ブロモスチレン 2.88           | 238          | 29         |
| 実施例1-6 | 0.57                      | スチレン 2.88                | 111          | 16         |
| 実施例1-7 | 0.57                      | スチレン 2.88                | 201          | 21         |

[0037] The reactant microsphere obtained in the two to example 1 example 1-1 was prepared to amount of solid content 2wt% using the phosphate buffer solution (0.1M, pH=7.4), 3ml (pH=9.0) of 20mg [ml] cow serum albumin (it abbreviates to BSA hereafter)-0.1M phosphate buffer solutions was added to these 5ml, and it incubated at 4 degrees C for 24 hours. After reaction termination, centrifugal separation was carried out (for 4000rpm and 10 minutes), it refined by repeating actuation in which 0.1M phosphate buffer solution (pH=7.4) permutes a supernatant, 3 times, and the BSA fixed microsphere was obtained.

[0038] The quantum of the amount of BSA immobilization of the obtained BSA fixed microsphere was carried out using the ninhydrin method. That is, after dissolving ninhydrin

400mg and hydrindantin 60mg in methyl-cellosolve 15ml, the ninhydrin solution was prepared by adding 5ml (pH=5.5) of sodium acetate buffer solutions. After, adding 1ml of 4-N hydrochloric acids to 1ml of BSA fixed microsphere dispersion liquid obtained by the above on the other hand and processing at 100 degrees C for 2 hours; 4 moreN sodium-hydroxide solution neutralized, and distilled water adjusted to 5ml correctly. Furthermore centrifugal separation (for 4000rpm and 10 minutes) was performed, 3ml of supernatants was measured, the 1ml of the above-mentioned ninhydrin solutions was added to this, and it incubated for 20 minutes at 100 degrees C. After carrying out water cooling, as a result of computing the amount of BSA immobilization from the calibration curve which measured the absorbance of 570nm with the spectrophotometer and was beforehand searched for by the same actuation, it was 25.8microg/ml.

[0039] Like example of comparison 1 example 1-1, the alpha-methacrylic-omega-methoxy polyoxyethylene (molecular weight 3000) was used instead of the polyoxyalkylene derivative of a formula (4), however microsphere dispersion liquid were prepared, and BSA was contacted still like the example 2-1. Although the ninhydrin method was tried like the example 2-1 about this microsphere, the amount of BSA immobilization is 0microg/ml, and it was checked that BSA is not fixed by the microsphere.

[0040] Like two to example 2 example 2-1, a 1mg [/ml ] Western Japanese horseradish peroxidase (it omits Following HRP) / 3ml (pH9.0) of 0.1M phosphate buffer solutions were used instead of BSA, however the HRP fixed microsphere was obtained. Next, the check of HRP immobilization of the obtained HRP fixed microsphere was checked by the coloring method by the enzyme activity of HRP. That is, when 100micro (10 mmol/l) of 1 and 2-phenylenediamine solutions l which are the substrate of HRP was added to 500micro of obtained HRP fixed microsphere dispersion liquid l, it incubated for 10 minutes at 30 degrees C and 10micro of 0.1 moreN sulfuric acids l was added, brown coloration was seen and immobilization of HRP was checked.

[0041] Like example of comparison 2 example 1-1, the alpha-methacrylic-omega-methoxy polyoxyethylene (molecular weight 3000) was used instead of the polyoxyalkylene derivative of a formula (4), however microsphere dispersion liquid were prepared, and HRP was contacted still like the example 2-2. Although the coloring method was tried like the example 2-2 about this microsphere, coloring was not seen but it was checked that HRP is not fixed by the microsphere.

[0042] Like two to example 3 example 2-1, anti-[ 10mg //ml ] Homo sapiens hemoglobin-goat IgG / 3ml (pH9.0) of 0.1M phosphate buffer solutions were used instead of BSA, however the antibody fixation-ized microsphere was obtained. Next, the check of immobilization of the antibody of the obtained antibody fixation-ized microsphere was authorized by the existence of the agglutination reaction based on an antigen-antibody reaction. That is, when 500micro of obtained antibody fixation-ized microsphere dispersion liquid l was added into 1ml of 500microg [/ml ] Homo sapiens hemoglobin-physiological sodium chloride solution and it incubated for 10 minutes at 37 degrees C, the aggregate was seen at the bottom of a reactor and it was checked that the antibody is fixed by the microsphere.

[0043] Like example of comparison 3 example 1-1, the alpha-methacryloyl-omega-methyl polyoxyethylene (molecular weight 3000) was used instead of the polyoxyalkylene derivative of

a formula (4), however microsphere dispersion liquid were prepared, and the antibody was contacted still like the example 2-3. Although the agglutination reaction of this microsphere was tried, condensation was not seen but it was checked that the antibody is not fixed by the microsphere.

---

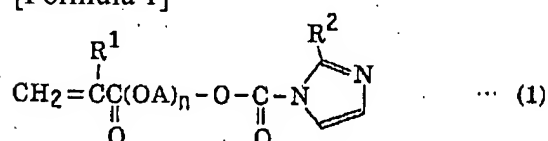
## CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] General formula (1)

[Formula 1]



Among [type, the oxyalkylene radical of carbon numbers 2-4 and n are the numbers of average addition mols of an oxyalkylene radical, and OA expresses the positive number of 1-1000. Even if one sort of things have added the oxyalkylene radical, two or more sorts of things may add it. Even if it has added in the shape of random in the case of two or more sorts, you may add in the shape of a block. R1 and R2 express a hydrogen atom or a methyl group independently, respectively.] The reactant microsphere characterized by coming out and consisting of an oxyalkylene derivative expressed (Pori) and a copolymer with a hydrophobic radical polymerization nature monomer.

[Claim 2] The functional matter fixed microsphere characterized by fixing the functional matter to a reactant microsphere according to claim 1.

---

[Translation done.]

---

[Translation done.]

D4.

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-133990

(43)Date of publication of application : 28.05.1996

(51)Int.Cl.

A61K 47/48  
A61K 9/16  
C08F220/36  
G01N 33/545  
// A61K 9/00  
A61K 39/385  
A61K 39/44  
A61K 49/00

(21)Application number : 06-276687

(71)Applicant : NIPPON OIL & FATS CO LTD

(22)Date of filing : 10.11.1994

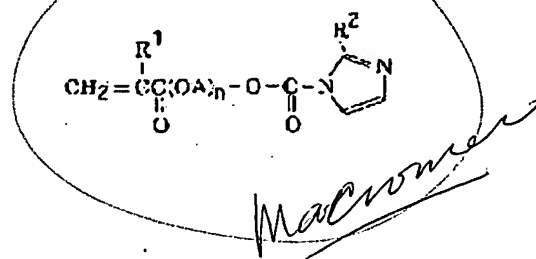
(72)Inventor : MIYAZAKI TAKESHI  
KOINUMA YASUYOSHI

## (54) REACTIVE MICROSPHERE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a reactive microsphere, comprising a specific copolymer, excellent in dispersion stability in water or an organic medium, capable of readily and stably immobilizing a functional substance such as a protein and hardly causing the nonspecific adsorption of the protein, etc.

CONSTITUTION: This microsphere comprises a copolymer of a (poly)oxyalkylene derivative of the formula [OA is a 2-4C oxyalkylene; (n) is the average number of added mol of OA and is 1-1000; R1 and R2 are each H or CH3] and a hydrophobic radically polymerizable monomer (preferably styrene). The microsphere is preferably obtained by polymerizing a compound of the formula with the radically polymerizable monomer in water or a mixed solvent of the water with ethanol in the presence of a radical polymerization initiator at 10-60° C for 1-24hr. Furthermore, the compound of the formula is obtained by reacting, e.g. a mono(meth)acrylic ester of a (poly)alkylene glycol with N,N'-carbonyldiimidazole.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than

the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-133990

(43) 公開日 平成8年(1996)5月28日

(51) Int. Cl.

識別記号

F I

A61K 47/48

B

9/16

E

C08F220/36

MLZ

G01N 33/545

Z

// A61K 9/00

C

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-276687

(22) 出願日 平成6年(1994)11月10日

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72) 発明者 宮崎 剛

茨城県つくば市梅園2-15-5

(72) 発明者 鯉沼 康美

茨城県つくば市東新井32-16

(74) 代理人 弁理士 柳原 成

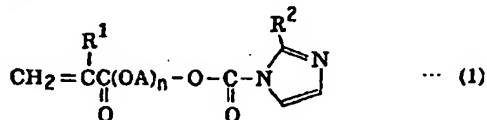
(54) 【発明の名称】 反応性マイクロスフェアー

(57) 【要約】

【目的】 マイクロスフェアー表面に機能性物質が共有結合により固定されたマイクロスフェアーであって、水中での分散安定性に優れ、しかもタンパク質などの非特異的吸着が起こりにくい機能性物質固定化マイクロスフェアーを得る。

【構成】 一般式(1)

【化1】

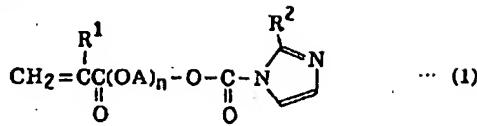


【OAはオキシアルキレン基、nは1~1000、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は水素またはメチル基】の化合物とスチレンとを、有機溶媒と水との混合溶媒中で重合させ、コアにポリスチレンが集積し、シェルにポリオキシアルキレン鎖が集積した構造を有する反応性マイクロスフェアーを得、次にこのマイクロスフェアー表面上のオキシカルボニルイミダゾール基と機能性物質中のアミノ基とを反応させ、機能性物質を固定する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 一般式(1)

## 【化1】



【式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。オキシアルキレン基は1種のものが付加していても、2種以上のものが付加していてもよい。2種以上の場合、ランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。R'およびR'はそれぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わす。】で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体と、疎水性のラジカル重合性単量体との共重合体からなることを特徴とする反応性マイクロスフェア。

【請求項2】 請求項1記載の反応性マイクロスフェアに機能性物質が固定されたことを特徴とする機能性物質固定化マイクロスフェア。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は(ポリ)オキシアルキレン誘導体をマクロモノマー成分とする反応性マイクロスフェア、およびこのマイクロスフェアに機能性物質が固定化された機能性物質固定化マイクロスフェアに関する。さらに詳しくは、診断薬、薬物運搬体、機能性塗料、機能性染料、機能性インクなどとして利用することができる反応性マイクロスフェアおよび機能性物質固定化マイクロスフェアに関する。

## 【0002】

【従来の技術】塗料または診断薬の分野においては、ポリスチレンからなるラテックスまたはマイクロスフェアが広く用いられている。しかし、ポリスチレンのみからなるラテックスまたはマイクロスフェアは、溶液中、特に水中での分散安定性が悪くて沈降しやすいため、これらを水系媒体中で単独で使用することは難しく、界面活性剤などとの併用が必要である。また、特に診断薬用の担体としてポリスチレンラテックスを用いる場合、ポリスチレンラテックス中にはタンパク質と反応する官能基が存在していないので、抗体の担持方法は吸着平衡によるものとなり、このため吸着担持される抗体量が制限されたり、あるいは吸着担持した抗体が脱離しやすいという問題点がある。さらに、検体中に共存する他のタンパク質などが非特異的に吸着し、検出感度や信頼性を低下させるなどの問題点もある。

【0003】このためスチレンなどと共重合させることにより、得られるポリスチレンラテックスまたはマイクロスフェアに水分散安定性を付与することができるモノマー、あるいは診断薬用高分子のモノマーとして使用

することにより、タンパク質などの機能性物質と容易に共有結合する官能基を有するモノマーが要望されているが、このような要望を十分に満足させる化合物は知られていない。従って、塗料または診断薬の分野における要望を十分に満足させるような水中での分散安定性に優れたマイクロスフェアは得られていない。またマイクロスフェア表面にタンパク質などの機能性物質を化学結合により容易に固定化することができるマイクロスフェアも得られていない。

【0004】ところで特開昭57-92332号には、片末端に重合性二重結合、他方の片末端に官能基を有するポリオキシアルキレン誘導体が開示され、感光性樹脂組成物のモノマー成分として利用されている。しかし、この化合物を、タンパク質等の機能性物質固定用の高分子を製造するためのマクロモノマーとして利用することは示唆されていない。

## 【0005】

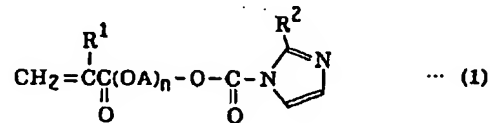
【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、水または有機媒体中での分散安定性に優れ、しかもタンパク質などの機能性物質を容易に化学結合により安定に固定化することが可能で、かつタンパク質などの非特異的吸着が起こりにくい反応性マイクロスフェアを提供することである。本発明の他の目的は、上記反応性マイクロスフェアにタンパク質などの機能性物質が化学結合により固定されたマイクロスフェアであって、固定化された物質の脱離が起らず、しかも固定化された物質の活性が十分に発揮される機能性物質固定化マイクロスフェアを提供することである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は次の反応性マイクロスフェア、この反応性マイクロスフェアに機能性物質が固定化された機能性物質固定化マイクロスフェアである。

## 【0007】(1)一般式(1)

## 【化2】



【式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。オキシアルキレン基は1種のものが付加していても、2種以上のものが付加していてもよい。2種以上の場合、ランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。R'およびR'はそれぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わす。】で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体と、疎水性のラジカル重合性単量体との共重合体からなることを特徴とする反応性マイクロスフェア。

(2)上記(1)記載の反応性マイクロスフェアに機

能性物質が固定されたことを特徴とする機能性物質固定化マイクロスフェア。

【0008】本発明において、「(ポリ)オキシアルキレン」はオキシアルキレンまたはポリオキシアルキレンを意味する。一般式(1)のOAで表わされるオキシアルキレン基は、炭素数2~4のオキシアルキレン基であり、オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシ-1-エチルエチレン基、オキシ-1,2-ジメチルエチレン基、オキシテトラメチレン基などがあげられる。これらのオキシアルキレン基は、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、オキセタン、1-ブテンオキシド、2-ブテンオキシド、テトラヒドロフランなどのアルキレンオキシドを付加重合させた基である。

【0009】一般式(1)のnは1~1000、好ましくは2~500、さらに好ましくは5~300の正数である。nが2以上の場合、オキシアルキレン基の種類は同一のもので、異なるものでもよい。後者の場合、ランダムに付加していても、ブロック状に付加していてもよい。親水性を付与する場合、OAとしてはエチレンオキシドが単独で付加したものが好ましく、この場合nが3以上のものが好ましい。また種類の異なるオキシアルキレンが付加している場合、エチレンオキシドが20モル%、好ましくは50モル%以上付加しているのが望ましい。(ポリ)オキシアルキレン鎖に親油性を付与する場合はエチレンオキシド以外の付加モル数を多くする。

【0010】オキシアルキレン基の種類の異なるものとしては、例えばオキシエチレン基とオキシプロピレン基とがランダムに付加したもの、ポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンのようにブロック状に付加したもの、またはポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレン

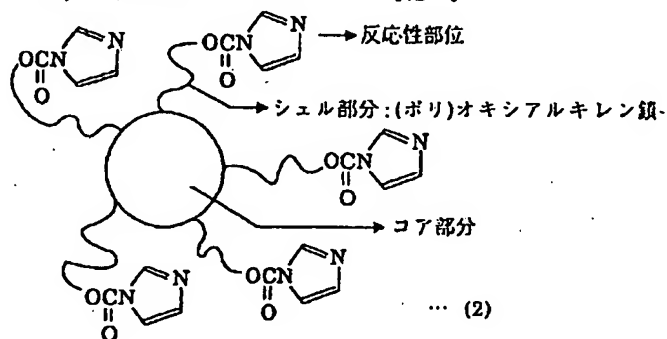
／ポリオキシエチレンのようにブロック状に付加したものなどがあげられる。

【0011】一般式(1)で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体は、例えば(ポリ)アルキレングリコールのモノメタクリル酸エステルまたはモノアクリル酸エステル、具体的には $\alpha$ -メタクリロイル- $\omega$ -ヒドロキシポリ(オキシエチレン)などと、N, N'-カルボニルジイミダゾールとを、無溶媒であるいはベンゼン、トルエン、クロロホルム、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサンなどの有機溶媒中で、-100~+150℃、好ましくは0~100℃で、10分間~100時間、好ましくは1~4時間反応させることにより容易に製造することができる。反応終了後は、抽出、蒸留、再結晶、再沈殿、透析、限外濾過、ゲル濾過、イオン交換樹脂処理、吸着剤処理などの方法により、容易に単離・精製することができる。

【0012】本発明の反応性マイクロスフェアは一般式(1)で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体と疎水性のラジカル重合性単量体との共重合体からなるものであり、コアに共重合体の主鎖が集積し、シェルに共重合体の側鎖である(ポリ)オキシアルキレン鎖が集積した構造を有する粒子であって、(ポリ)オキシアルキレン鎖の先端に、アミノ基、水酸基またはチオール基などの官能基、特に第1級アミノ基に対して高い反応活性を有するオキシカルボニルイミダゾール基またはその置換基が存在している。反応性マイクロスフェアの粒径は特に限定されないが、平均粒径1~1000nm、好ましくは100~500nmのものが望ましい。

【0013】本発明の反応性マイクロスフェアを模式的に示すと次式(2)のように表すことができる。

【化3】



【0014】本発明の反応性マイクロスフェアに親水性を付与する場合、一般式(i)で表される(ポリ)オキシアルキレン誘導体としてはOAがエチレンオキシドの単独付加であるものを使用するのが好ましく、特にnが3以上のものを使用するのが好ましい。オキシアルキレン基の種類が異なる場合、エチレンオキシドが20モル%以上、好ましくは50モル%以上付加しているポリオキシアルキレン誘導体を使用するのが望ましい。この

ようなポリオキシアルキレン誘導体を用いることにより、前記式(2)に示したように、親水性のポリオキシアルキレン鎖がマイクロスフェアの表面に集積するので、水分散安定性に優れたマイクロスフェアが得られる。またこのような反応性マイクロスフェアは、ポリオキシエチレン鎖またはオキシエチレン基の付加モル数の多いポリオキシアルキレン鎖が両親媒性を示すので、酢酸エチル、エタノール、メタノール、プロパノール、



ブタノールなどの有機溶媒中においても分散安定性に優れている。反応性マイクロスフェアに親油性を付与する場合、エチレンオキシド以外のアルキレンオキシドの付加モル数が多い(ポリ)オキシアルキレン誘導体を使用する。

【0015】前記疎水性のラジカル重合性単量体としては、一般式(1)で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体とラジカル重合可能な疎水性の単量体が使用でき、例えばスチレン、p-クロロスチレン、m-クロロスチレン、p-プロモスチレン、m-プロモスチレン、p-メチルスチレン、m-メチルスチレン、p-エチルスチレン、m-エチルスチレン、p-ジビニルベンゼン、m-ジビニルベンゼン等のスチレン誘導体；ベンジル(メタ)アクリレート、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、ブチル(メタ)アクリレート等のアクリル誘導体；酢酸ビニル、安息香酸ビニル等のビニルエステル誘導体などがあげられる。これらの中ではスチレン誘導体、特に比重が小さく生成する反応性マイクロスフェアの水分散液状態での安定性に特に優れるという理由からスチレンが好ましい。

【0016】本発明の反応性マイクロスフェアは、一般式(1)で表される(ポリ)オキシアルキレン誘導体と疎水性のラジカル重合性単量体とを、水および水と混合可能な有機溶媒の混合溶媒中でラジカル重合させることにより製造することができる。上記有機溶媒としては、メタノール、エタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジメチルアセタミドなどが好ましく使用できる。これらの中では、特にエタノールが好ましい。有機溶媒と水との混合割合は、有機溶媒：水の体積比で5：95～99：1(5～99体積%)、好ましくは50：50～95：5(50～95体積%)とするのが望ましい。反応溶媒として水単独または有機溶媒単独で用いても、反応性マイクロスフェアは形成されない。

【0017】一般式(1)で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体とラジカル重合性単量体との配合割合は、(ポリ)オキシアルキレン誘導体：単量体のモル比で0.01：99.9～50：50、好ましくは0.5：99.5～30：70とするのが望ましい。上記範囲外になると反応性マイクロスフェアが形成されにくくなる。混合溶媒中の総モノマー濃度は0.001～1.00mol/l、好ましくは0.1～1.0mol/lとするのが望ましい。この範囲外になると反応性マイクロスフェアが形成されにくくなる。

【0018】反応はラジカル重合開始剤の存在下に行うのが好ましい。ラジカル重合開始剤としては、10時間半減期温度が10～150℃の過酸化物質またはアゾ系化合物が好ましい。例えば、過硫酸アンモニウム等の無機過酸化物質；過酸化ベンゾイル、t-ブチルヒドロペル

キシド、ジイソプロピルペルオキシジカーボネート、t-ブチルペルオキシ(2-エチルヘキサノエート)等の有機過酸化物質；2,2'-アゾビス[2-(5-メチル-2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]、2,2'-アゾビスイソブチロニトリル、2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)二塩酸塩、2,2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)等のアゾ系化合物などがあげられる。ラジカル重合開始剤の使用割合は、総モノマーモル数に対して0.001～10mol%、好ましくは0.1～5mol%とするのが望ましい。

【0019】重合反応は、脱気封管中で、または窒素、アルゴン、二酸化炭素などの不活性ガス雰囲気下で、反応温度0～150℃、好ましくは10～60℃、反応時間30分間～100時間、好ましくは1～24時間の条件で行うことができる。

【0020】また別の方法として、紫外線、電子線、γ線などの照射による光・放射線重合法などの方法によっても同様に反応性マイクロスフェアを得ることができる。このようにして、重合時のモノマー濃度、溶媒組成、モノマー組成などの諸条件を選択することにより、平均粒径1～1000nm、CV値5～30%程度の単分散性に優れた反応性マイクロスフェアを得ることができる。得られた反応性マイクロスフェアはそのまま、あるいは遠心分離、沈降分離、透析、限外濾過、ゲル濾過、イオン交換樹脂処理、吸着剤処理などの方法により精製した後、使用することができる。

【0021】本発明の反応性マイクロスフェアは前記式(2)に示されているように、コアに主鎖部分が集積し、シェルに(ポリ)オキシアルキレン鎖が集積した構造のものであり、水や有機溶媒中での分散安定性に優れている。さらに、(ポリ)オキシアルキレン鎖の先端に反応性に優れたオキシカルボニルイミダゾール基またはその置換基が存在し、この基が機能的物質固定用のリガンドとなるため、種々の機能的物質を化学的結合により固定化することが可能である。このため、機能的物質を固定する基材(担体)として好適に使用することができる。またその他にも、コア部に染料や顔料を溶込ませて機能的染料として使用できるほか、機能的インク、機能的塗料などとしても使用することもできる。

【0022】本発明の機能的物質固定化マイクロスフェアは、前記反応性マイクロスフェアに機能的物質が化学結合(共有結合)により固定されたマイクロスフェアである。固定化する機能的物質は特に限定されないが、例えば色素、染料、放射線ラベル化合物、蛍光化合物、化学発光化合物、電極感応性化合物等の標識物質；光応答性化合物、pH応答性化合物、熱応答性化合物等

10

20

30

40

50

の外部刺激応答性化合物；酵素、抗体、抗原、その他のタンパク質、糖、脂質、糖タンパク質、糖脂質、ホルモン等の生理活性物質；医薬などがあげられる。これらの中では、分子中にアミノ基、水酸基またはチオール基を有するものが好ましく、特にオキシカルボニルイミダゾール基またはその置換基と容易に反応する第1級アミノ基を有するものが好ましい。

【0023】上記抗体の具体的なものとしては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、これらの一部ユニットなどがあげられる。これらの抗体はヒト、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ニワトリなど、いかなる動物種由来のものであっても、またいかなるハイブリドーマに由来するものであってもよい。また上記抗原の具体的なものとしては、タンパク質、オリゴ糖、高分子糖、低分子ハプテン、コレステロールなどがあげられる。ただしハプテンの場合には、固定化のために、その分子内にアミノ基、水酸基またはチオール基のいずれかの官能基を有することが必要である。このような抗体または抗原が固定化されたマイクロスフェアは、診断薬として好適に利用される。

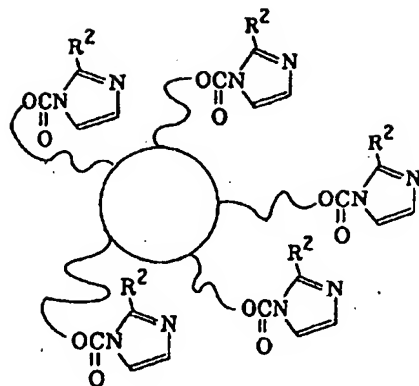
【0024】機能性物質の固定化は反応性マイクロスフェアのオキシカルボニルイミダゾール基またはその置換基と、機能性物質のアミノ基、水酸基またはチオール基などの官能基との間で、アミド結合、エステル結合またはチオールエステル結合などの共有結合を形成することにより行われる。本発明の機能性物質固定化マイクロスフェアは、前記反応性マイクロスフェアと機能性物質とを接触させることにより容易に製造することができる。接触方法としては、反応性マイクロスフェアの懸濁液に機能性物質を添加して攪拌する方法などが採用できる。

【0025】本発明の反応性マイクロスフェアへの機能性物質の固定化は、反応溶媒中で反応性マイクロスフェアと機能性物質とを反応させることにより行うことができる。反応溶媒としては、水、生理的食塩水、または $\text{pH}=5\sim 12$ 、好ましくは $7\sim 11$ のリン酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液等の緩衝液；エタノール、メタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、1, 4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセタミド、ジメチルスルホキシド等の有機溶媒；これらの有機溶媒と水、生理的食塩水または前記緩衝液との混合溶媒などを使用することができる。

【0026】反応溶液中の反応性マイクロスフェアの濃度は、 $0.001\sim 50$ 重量%、好ましくは $0.01\sim 30$ 重量%、機能性物質の濃度は $1\text{nmol/l}\sim 1\text{mol/l}$ 、好ましくは $1\mu\text{mol/l}\sim 100\text{mmol/l}$ とするのが望ましい。反応温度は $0\sim 100^\circ\text{C}$ 、好ましくはアミノ基との反応の場合は $25\sim 60^\circ\text{C}$ 、水酸基またはチオール基との反応の場合は $30\sim 80^\circ\text{C}$ 、反応時間は10分間 $\sim 200$ 時間、好ましくは1分間 $\sim 48$ 時間とするのが望ましい。このような条件の範囲外になるとマイクロスフェアの安定性が悪くなる傾向にある。機能性物質を固定したマイクロスフェアを診断薬として利用する場合は、反応性マイクロスフェアとしては平均粒径が $100\sim 500\text{nm}$ のものを使用するのが好ましい。

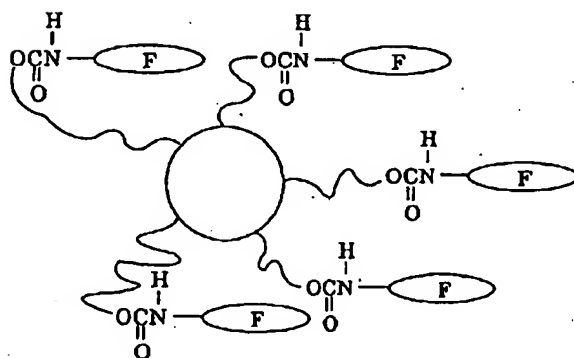
【0027】反応性マイクロスフェアとアミノ基を有する機能性物質との固定化反応を模式的に示すと次式(3)のようになる。

【化4】



反応性マイクロスフェア

$\text{H}_2\text{N}-\text{F}$  ; 機能性物質



機能性物質固定化マイクロスフェア

... (3)

【0028】反応終了後の混合物は、遠心分離、沈降分離、ゲルろ過、限外ろ過、透析、イオン交換樹脂処理、吸着剤処理などの方法により精製することができる。このようにして得られた機能性物質固定化マイクロスフェアは、機能性物質が共有結合により固定されているので、機能性物質の脱離は起こらず、安定に固定化されたものとなる。また表面に(ポリ)オキシアルキレン鎖が集積しているのでタンパク質などの非特異的な吸着も起こりにくく、このため機能性物質固定化マイクロスフェアを診断薬として用いた場合でも、検出感度や信頼性の高いものとなる。さらに固定化された機能性物質の活性も十分に発揮される。本発明の機能性物質固定化マイクロスフェアは、診断薬の他にも固定化酵素、薬物運搬体などとしても利用することができる。

【0029】

【発明の効果】本発明の反応性マイクロスフェアは、一般式(1)で表される(ポリ)オキシアルキレン誘導体と疎水性のラジカル重合性単量体との共重合体から構成されているので、水または有機溶媒中での分散安定性

に優れるとともに、機能性物質を容易に化学結合により安定に固定化することができる。また反応性マイクロスフェアにはタンパク質などの非特異的な吸着が起こりにくい。

【0030】本発明の機能性物質固定化マイクロスフェアは、上記反応性マイクロスフェアに機能性物質が化学結合により固定されているので、機能性物質の脱離は起こらず、しかも固定化された機能性物質の活性が十分に発揮される。

【0031】

【実施例】以下、実施例により、さらに詳細な説明を行うが、本発明はこれらに限定されるものではない。

合成例1

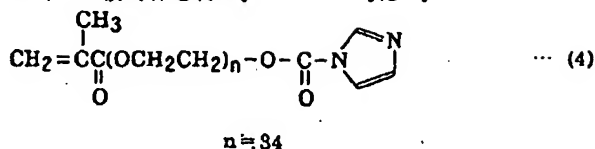
ベンゼン中、 $\alpha$ -メタクリロイル- $\omega$ -ヒドロキシポリオキシエチレン ( $n \approx 7.6$ ) 10.00g (23.8 mmol) およびN, N'-カルボニルジイミダゾール 3.86g (26.2 mmol) を混合し、室温で24時間攪拌した。これを蒸留水20mlで3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後凍結乾燥し、白色粉末状

11

12

の下式(4)のポリオキシアルキレン誘導体を得た。

【化5】



## 【0032】実施例1-1

溶媒となる80%エタノール水溶液(水:エタノール=2:8(v/v))5mlに、重合開始剤として2, 2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン] 2.5mg(100 $\mu$ mol;全モノマーに対して1.5mol%)、合成例1で得たポリオキシアルキレン誘導体0.57mmol、およびスチレン2.88mmolを仕込み、脱気封管中、60℃で48時間緩やかに振盪させながら重合を行った。その後、大量の蒸留水中にて48時間透析し、反応性マイクロスフェア一分散液を得た。得られた反応性マイクロスフェアの粒径をCOULTER N4型サブミクロン粒子分析計を用いて測定した。平均粒径およびCV値を表1に示

す。

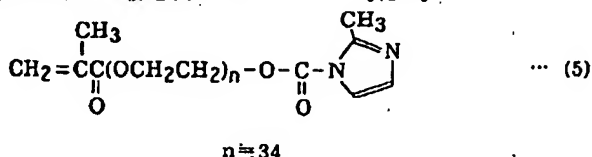
## 【0033】実施例1-2~1-5

実施例1-1と同様にして、ただし表1の通りモノマー配合を種々変えて、反応性マイクロスフェアを得た。なお、各実施例とも重合開始剤は全モノマーに対して1.5mol%になる量で用いた。得られた反応性マイクロスフェアの粒径とCV値を表1に示す。

## 【0034】実施例1-6

実施例1-1と同様にして、ただし下式(5)のポリオキシアルキレン誘導体を用いて反応性マイクロスフェアを得た。得られた反応性マイクロスフェアの粒径とCV値を表1に示す。

【化6】

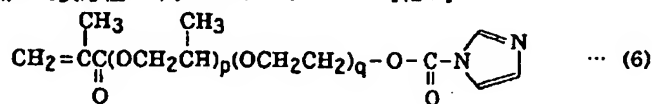


## 【0035】実施例1-7

実施例1-1と同様にして、ただし下式(6)のポリオキシアルキレン誘導体を用いて反応性マイクロスフェア

一を得た。得られた反応性マイクロスフェアの粒径とCV値を表1に示す。

【化7】



$p \approx 5, q \approx 30$ (ブロック共重合体)

【0036】

【表1】

表1

|        | (ポリ)オキシアルキレン誘導体<br>(mmol) | ラジカル重合性<br>単量体<br>(mmol) | 平均粒径<br>(nm) | CV値<br>(%) |
|--------|---------------------------|--------------------------|--------------|------------|
| 実施例1-1 | 0.57                      | スチレン 2.88                | 106          | 15         |
| 実施例1-2 | 0.57                      | スチレン 5.76                | 114          | 17         |
| 実施例1-3 | 0.57                      | スチレン 8.64                | 122          | 23         |
| 実施例1-4 | 0.57                      | p-クロロスチレン2.88            | 178          | 28         |
| 実施例1-5 | 0.57                      | p-プロモスチレン2.88            | 238          | 29         |
| 実施例1-6 | 0.57                      | スチレン 2.88                | 111          | 16         |
| 実施例1-7 | 0.57                      | スチレン 2.88                | 201          | 21         |

【0037】実施例2-1

50 実施例1-1で得られた反応性マイクロスフェアをリ

ン酸緩衝液 (0.1M, pH=7.4) を用いて固形分量 2wt% に調製し、この 5ml に、20mg/ml の牛血清アルブミン (以下、BSA と略す) - 0.1M リン酸緩衝液 (pH=9.0) 3ml を加え、4℃ で 24 時間インキュベートした。反応終了後、遠心分離 (4000rpm, 10分間)、上澄みを 0.1M リン酸緩衝液 (pH=7.4) で置換する操作を 3 回繰り返すことにより精製を行い、BSA 固定化マイクロスフェアを得た。

【0038】得られた BSA 固定化マイクロスフェアの BSA 固定化量を、ニンヒドリン法を用いて定量した。すなわち、ニンヒドリン 400mg、ヒドリンゲンチン 60mg をメチルセロソルブ 15ml に溶解した後、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH=5.5) 5ml を加えることによりニンヒドリン溶液を調製した。一方、上記により得られた BSA 固定化マイクロスフェア分散液 1ml に 4N 塩酸を 1ml 加え、100℃ で 2 時間処理した後、さらに 4N 水酸化ナトリウム溶液により中和し、蒸留水にて正確に 5ml に調整した。さらに遠心分離 (4000rpm, 10分間) を行い、上澄み 3ml を計り取り、これに上記ニンヒドリン溶液 1ml を加え、100℃ で 20 分間インキュベートした。水冷した後、分光光度計にて 570nm の吸光度を測定し、あらかじめ同様の操作で求めた検量線より BSA 固定化量を算出した結果、25.8μg/ml であった。

#### 【0039】比較例 1

実施例 1-1 と同様にして、ただし式 (4) のポリオキシアルキレン誘導体の代わりに α-メタクリル-ω-メトキシポリオキシエチレン (分子量 3000) を用いて、マイクロスフェア分散液を調製し、さらに実施例 2-1 と同様にして BSA を接触させた。このマイクロスフェアについて実施例 2-1 と同様にしてニンヒドリン法を試みたが、BSA 固定化量は 0μg/ml であり、BSA はマイクロスフェアに固定化されていないことが確認された。

#### 【0040】実施例 2-2

実施例 2-1 と同様にして、ただし BSA の代わりに 1mg/ml の西洋山葵ペルオキシダーゼ (以下 HRP と略す) / 0.1M リン酸緩衝液 (pH9.0) 3ml を用いて、HRP 固定化マイクロスフェアを得た。次に

得られた HRP 固定化マイクロスフェアの HRP 固定化の確認を、HRP の酵素活性による発色法により確認した。すなわち、得られた HRP 固定化マイクロスフェア分散液 500μl に、HRP の基質である 1, 2-フェニレンジアミン溶液 (10mmol/l) 100μl を加え、30℃ で 10 分間インキュベートし、さらに 0.1N 硫酸 10μl を加えたところ、褐色の呈色が見られ、HRP の固定化が確認された。

#### 【0041】比較例 2

実施例 1-1 と同様にして、ただし式 (4) のポリオキシアルキレン誘導体の代わりに α-メタクリル-ω-メトキシポリオキシエチレン (分子量 3000) を用いて、マイクロスフェア分散液を調製し、さらに実施例 2-2 と同様にして HRP を接触させた。このマイクロスフェアについて実施例 2-2 と同様にして発色法を試みたが、発色はみられず、HRP はマイクロスフェアに固定化されていないことが確認された。

#### 【0042】実施例 2-3

実施例 2-1 と同様にして、ただし BSA の代わりに 10mg/ml の抗ヒトヘモグロビン-ヤギ IgG / 0.1M リン酸緩衝液 (pH9.0) 3ml を用いて、抗体固定化マイクロスフェアを得た。次に得られた抗体固定化マイクロスフェアの抗体の固定化の確認を、抗原抗体反応に基づく凝集反応の有無により検定した。すなわち、得られた抗体固定化マイクロスフェア分散液 500μl を、500μg/ml のヒトヘモグロビン-生理的食塩水 1ml 中に加え、37℃ で 10 分間インキュベートしたところ、反応器の底に凝集物がみられ、抗体がマイクロスフェアに固定化されていることが確認された。

#### 【0043】比較例 3

実施例 1-1 と同様にして、ただし式 (4) のポリオキシアルキレン誘導体の代わりに α-メタクリル-ω-メチルポリオキシエチレン (分子量 3000) を用いて、マイクロスフェア分散液を調製し、さらに実施例 2-3 と同様にして抗体を接触させた。このマイクロスフェアの凝集反応を試みたが、凝集はみられず、抗体はマイクロスフェアに固定化されていないことが確認された。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

A61K 9/00  
39/385  
39/44  
49/00

識別記号

F

庁内整理番号

A

F I

技術表示箇所